

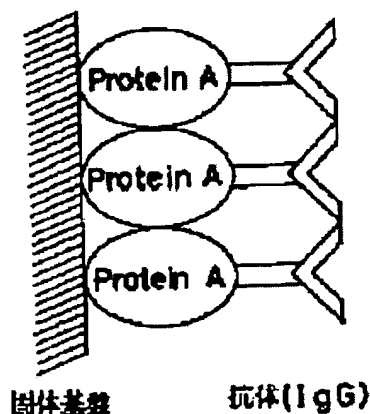
METHOD FOR IMMOBILIZING ANTIBODY PROTEIN BY PROTEIN A MOLECULAR FILM AND ANTIBODY IMMOBILIZED FILM

Patent number: JP5273212
Publication date: 1993-10-22
Inventor: OWAKU MITSU HARU; others: 02
Applicant: POLA CHEM IND INC
Classification:
- **International:** G01N33/543; C07K17/00; G01N27/327; G01N33/547
- **European:**
Application number: JP19920003257 19920110
Priority number(s):

Abstract of JP5273212

PURPOSE: To provide an ultra-thin antibody immobilized film enhanced in antibody density and having high reactivity and high sensitivity, that is, rapid response and to obtain a biosensor, a bioreactor, a bioelectronics device and an immunoassay substrate from said film.

CONSTITUTION: An aqueous solution of protein A is dropped and developed on the surface of the water to be transferred to a glass substrate and antibody protein (anti-human serum albumin antibody) is allowed to act on the formed built-up film of protein A to immobilize antibody protein and a biosensor is formed using the obtained ultrathin antibody immobilized film. This antibody immobilized film is easily obtained by simple operation and, since the antibody immobilized film bonds the FC region of an antibody to a protein A.LB film, the antigen confirming region of the antibody is turned to the outside and, by changing an antibody, antibody films to various antigens can be formed and a sensor obtained using the antibody immobilized film can be easily reacted with an antigen to be measured.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-273212

(43) 公開日 平成5年(1993)10月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	Z	9217-2 J		
C 0 7 K 17/00		7731-4 H		
G 0 1 N 27/327				
33/547		9015-2 J		
		7235-2 J		
			G 0 1 N 27/30	3 5 7
			審査請求 未請求	請求項の数 4 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平4-3257

(22) 出願日 平成4年(1992)1月10日

(71) 出願人 000113470

ポーラ化成工業株式会社

静岡県静岡市弥生町6番48号

(72) 発明者 大和久 光治

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1

ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72) 発明者 後藤 正弘

神奈川県横浜市神奈川区高島台27番地1

ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72) 発明者 相澤 益男

東京都杉並区天沼2-19-14

(74) 代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

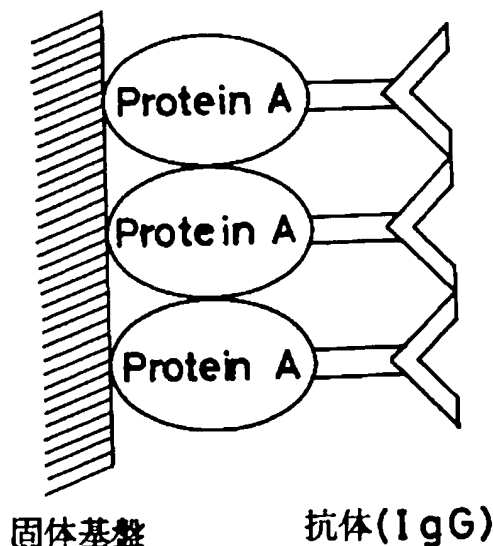
(54) 【発明の名称】 プロテインA分子膜により抗体タンパク質を固定化する方法及び抗体固定膜

(57) 【要約】

【目的】本発明は抗体密度が高く、高い反応性、高感度、即ち速い応答性、超薄膜の抗体固定膜及びそれより得られるバイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス及び免疫測定基盤を提供する。

【構成】プロテインAの水溶液を水面に滴下展開し、ガラス基盤上に移し取り、このプロテインAの累積膜上に抗体タンパク（抗ヒト血清アルブミン抗体）を作用させて抗体タンパクを固定化する方法、及びそれを用いて作成されたバイオセンサー。

【効果】本発明の固定化方法は簡単な操作で容易に目的とする超薄の抗体固定膜が得られ、得られた抗体固定膜は抗体のFc部位とプロテインA・LB膜と結合するため、抗体の抗原認識部位が外側を向いており、抗体を変えることにより種々の抗原に対する抗体膜を作ることができ、この抗体固定膜を用いて得られるセンサーは測定対象となる抗原と容易に反応することが出来るセンサーが得られる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロテインAの水溶液を水面に滴下展開し、固体表面に写し取った後、プロテインAの膜上に抗体タンパク質を作用させることにより、抗体タンパクを固定化する方法。

【請求項2】 請求項1の方法で得られた抗体固定膜。

【請求項3】 請求項2の抗体固定膜を用いたバイオセンサー、バイオリアクターもしくはバイオエレクトロニクスデバイス。

【請求項4】 請求項2の抗体固定膜を用いた酵素免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗体タンパクの固定化法に関する。更に詳しくは、バイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス、免疫測定基盤に有用な抗体固定膜を得るために、ラングミュア・プロジェクト (LB) 法を利用して、抗原抗体反応の活性を保持した状態で抗体タンパクを固体基盤上に高密度に固定する方法、その方法により得られた抗体固定膜及び該抗体固定膜を用いたバイオセンサー等に関する。

【0002】

【従来の技術】 いわゆる抗体固定化法には、(1) 抗体タンパクのアミノ基またはカルボキシル基と、反応または吸着結合出来る官能基を有する固体表面上に固定化する方法、(2) 親水ゲル中に抗体タンパクを抱き込ませて、固体基盤上に固定化する方法、及び(3) LB法を利用した抗体固定化法として、水面に脂質膜を展開し、水層中から抗体タンパクを吸着又は取り込ませる方法 (J. Cell. Biochem., 29 239(1985).) 或いは水面に水不溶性ポリ (オレフィン-無水マレイン酸) 単分子膜に当該水相中に溶解した水溶性抗体タンパク質を接触させることにより当該水相界面で抗体タンパク-単分子膜複合体を形成させ、それを固体基板上に積層する方法 (特開昭63-38164号) が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前記(1)の方法では化学反応により固体表面に結合させるため、固定化の反応条件によっては、抗体タンパクの変性や、非特異的反応による抗原認識部位の変性が起こり易く、前記(2)の方法では抗原がゲル中の抗体と接触しにくい、抗原抗体反応が阻止され易い等の問題を有していた。また(3)のLB法を利用した抗体固定化法では抗体と脂質膜の結合は吸着結合であるため、抗体が離脱し易いという問題を有しており、また、従来のこの種の方法では抗体タンパクをLB膜作成用の水層に溶解して固定化するため、貴重な抗体を多量に必要とするという欠点があった。そして従来の抗体固定膜を用いた免疫測定法では、(1) 抗原、抗体の固相化に1夜、(2) 測定物との反応に数時間、(3) 2次抗体の反応、(4) 酵素反応、

等測定のためのステップ数が多く、測定終了までに長い時間を要していた。又、バイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス、免疫測定基盤の作成には、抗体固定膜は高い反応性、高感度、即ち固定化抗体量が多いこと、速い応答性、微小化、即ち超薄膜であることが要望されている。しかし、従来のものでは抗体密度が低いこと、膜が厚いことからこれらバイオセンサー等の作成は困難であった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の問題を解決すべく鋭意研究の結果、単分子膜形成物質としてプロテインAを用い、プロテインAから得られた膜に抗体を固定化したとき、従来の抗体固定化方法の問題を解決し得、それにより得られた抗体固定化膜は従来の抗体固定化膜に比して、抗体が離脱することなく、抗体活性、抗体密度が高く、かつ均一な抗体固定膜であることを見出し、本発明に到達したのである。即ち、本発明は、(1) プロテインAの水溶液を水面に滴下展開し、形成された膜を膜が破壊されるより低い表面圧力で圧縮保持し、固体表面に移し取った後、プロテインAの膜上に抗体タンパク質を作用させることにより、抗体タンパクを固定化する方法、(2) 該方法により得られた抗体固定膜、(3) 該抗体固定膜を用いたバイオセンサー、バイオリアクターもしくはバイオエレクトロニクスデバイス及び(4) 該抗体固定膜を用いた酵素測定法に関する。本発明では、水層表面に展開されたプロテインAをLB法により固体基盤に写し取り、プロテインAの単分子膜、あるいは累積膜上に抗体タンパクの溶液を接触させ、プロテインA・LB膜上に抗体タンパク質を固定化するものであり、上記の方法で得られた抗体固定膜を用いたバイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス、免疫測定基盤に関する。本発明で用いるプロテインAは黄色ブドウ球菌の菌体表面、あるいは菌体外に放出される、分子量が15000から52000のタンパク質である。又、本発明でいう抗体タンパク質とは、免疫グロブリンG (IgG) である。IgGは疎水性末端部位 (Fc) と抗原と特異的に反応する抗原認識部位 (Fab) を持つ分子量約150000のタンパク質である。プロテインAは哺乳動物の免疫グロブリン、特にIgGのサブクラスであるIgG₁、IgG₂、IgG₄、のFc部位と特異的に結合する性質があり、この性質を利用して高い抗体密度の抗体固定化が実現できる。

【0005】 本発明の抗体固定化膜は例えば以下のような方法でLB法を適用して得ることが出来る。即ち、プロテインAを溶媒に溶解し、この溶液をLB装置において水面上に滴下、あるいは流下し展開させる。気液界面にはプロテインA単分子膜が形成される。この膜を膜が破壊される圧力より低い表面圧に圧縮保持し、固体基盤上に写し取る。単分子膜の累積を行う場合は、なるべく

高い表面圧力に圧縮することが好ましい。ここで溶媒は水あるいはリン酸等の緩衝溶液であり、プロテインAの濃度は0.05から1g/lである。又、膜への圧縮圧はプロテインAが単分子状態を保つことが出来る圧力で通常7から13mN/mである。固体基盤としては通常ガラス、石英、金属（金、白金）、プラスチック、シリコンウェハー等が用いられる。又、プロテインA単分子膜を累積した累積膜は常法により得ることが出来、例えば水面上にプロテインAの単分子膜を形成した後、水平付着法あるいは垂直上下法により単分子膜を基盤上に移し取るといった操作を繰り返すことにより累積膜を得ることが出来る。

*

【表1】

プロテインA	0.05mg/ml～1mg/ml(0.5mg/ml)
展開	LB膜製造装置中に展開 水層 水 5～40℃(15℃) 緩衝溶液 マイクロシリンジで滴下 ガラス棒で流下
表面圧力	7～13mN/m
積層	垂直上下法 水平付着法 固体基盤 ガラス、石英、シリコンウェハー、金、白金、プラスチック
抗体溶液	接触 浸漬 抗体溶液 できるだけ高濃度(10^{-2} ～20mg/ml) 10mg/ml
洗浄	未反応抗体を洗い流す 水、生理的リン酸緩衝溶液(PBS) 0.05%Tween20含むPBS

【0008】このように固定化された抗体固定膜は、プロテインA・LB膜と抗体のFc部位の結合により抗体を基盤に固定しているため、抗体タンパクは変性を起こさず、抗原認識部位の活性を完全に保持したまま高い抗体密度で基盤上に固定化されている。図1に本発明の抗体固定膜の模式図を示す。抗体はプロテインA単分子膜にFc部位で結合し抗原認識部位であるFab部位が表面に向いた状態で並んでいる。このことは抗原との反応が速くしかも効率よく行う事が出来る。次にバイオセンサーについて述べると、固定基盤上、例えば、石英基盤上にプロテインA膜を積層し、抗体溶液中に浸漬し、該抗体を固定化し、この抗体に対する抗原をあらかじめ蛍光剤等で標識しておき、この標識抗原と測定対象物の抗原とを競争反応させるか、または、標識抗原をあらかじめプロテインA上の固定化された抗体と反応させておき、測定対象物である抗原と交換反応をさせることによ

40

り、バイオセンサーを作製する。又、同様にして、本発明の抗体固定膜を用いてバイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス、免疫測定基盤を作成することが出来る。

【0009】

【作用】本発明の抗体固定膜は、基盤膜に対し生化学的親和力で結合するため強固で高密度な抗体膜を得ることが出来る。本発明の抗体固定膜では抗体のFc部位とプロテインA・LB膜とが結合するため、抗体を変えることにより種々の抗原に対する抗体膜を作ることが出来る。そして、この抗体固定膜を用いてセンサーを作製した場合、抗体の抗原認識部位が外側を向いているため、測定対象となる抗原と容易に反応することができ、したがって得られるバイオセンサー、バイオリアクター、バイオエレクトロニクスデバイス、免疫測定基盤等は、優れた作用効果を有する。

50

【0010】

【実施例】

実施例1. 抗ヒト血清アルブミン抗体の固定化

プロテインA水溶液 (0.5 mg/ml) $50 \mu\text{l}$ をL
B膜製造装置の清浄な水面上にマイクロシリンジを用い
て展開させた。表面圧を 12 mN/m に保ちプロテイン
Aの単分子膜をステアリルトリクロルシランで疎水化処
理した無蛍光ガラス基盤上に2層積層した。この基盤を
抗ヒト血清アルブミン抗体の生理的リン酸緩衝溶液*1

(10 mg/ml) 中に1時間浸漬する。生理的リン酸
緩衝溶液で十分洗浄後、フルオレセインイソチオシアネ
ート標識したヒト血清アルブミン溶液 $10^{-6} \sim 10^{-1} \text{ mg/ml}$ に1時間浸漬した。図2に示すように、ヒト血
清アルブミン濃度の増加と共に蛍光強度が増加した。こ
の結果は、抗ヒト血清アルブミン抗体は活性を十分保持
しプロテインA単分子膜上に固定化されていることを示
している。又、プロテインA単分子膜上に抗体タンパク
質が結合しているため固定化抗体膜を超薄膜の状態で作
製することが出来た。

*1: 組成 $0.15 \text{ M NaCl} + 0.01 \text{ M}$ リン酸
ナトリウム ($\text{pH} 7.0$)。

【0011】 実施例2. ヒトIgEセンサー

プロテインA水溶液 (0.5 mg/ml) $50 \mu\text{l}$ をL
B膜製造装置の清浄な水面上にマイクロシリンジを用い
て展開させた。表面圧を 12 mN/m に保ちプロテイン
Aの単分子膜をステアリルトリクロルシランで疎水化処
理した無蛍光ガラス基盤上に2層積層した。この基盤を
抗ヒトIgE抗体の生理的リン酸緩衝溶液 (5 mg/ml)
中に1時間浸漬する。 0.05% Tween 20を
含む生理的リン酸緩衝溶液で十分洗浄後、フルオレセイ

ンイソチオシアネート標識したラットIgE溶液 (0.2 mg/ml) と $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ mg/ml}$ のヒトIgE
を含む人工血清 (8%ウシ血清アルブミンを含む生理
的リン酸緩衝溶液) 中に基盤を1時間浸漬した。図3に
示すようにIgE濃度が $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ mg/ml}$ で蛍
光強度が直線的に変化し定量性のあることが判った。

【0012】

【発明の効果】 プロテインA単分子膜上に抗体タンパク
質が結合しているため固定化抗体膜を超薄膜の状態で作
製することができ、得られた本発明の抗体固定膜は基盤
膜に対し生化学的親和力で結合しているため強固で高密
度のものとなる。又抗体を変えることにより種々の抗原
に対する抗体膜を容易に短時間に作ることができる。本
発明の抗体固定膜は抗体のFc部位とプロテインA・L
B膜とが結合するため抗体の抗原認識部位が外側を向い
ており、そのため、この抗体固定膜を用いてセンサーを
作製した場合、測定対象となる抗原と容易に反応するこ
とが出来るといふ長所がある。従来、この膜のように抗
体の向きをコントロール (抗原認識部位を外側に向ける
事) することは出来なかった。又本抗体固定基盤を用い
たセンサーは従来の酵素反応等の測定のための時間を大
巾に短縮でき、操作性が極めて良好である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の抗体固定膜の模式図である。

【図2】 本発明の抗体固定膜によるヒト血清アルブミン
の濃度と蛍光強度との関係を示すグラフである。【図3】 本発明の抗体固定膜を用いたヒトIgEセンサ
ーのIgE濃度に対する蛍光強度変化を示すグラフであ
る。

【図1】

【図2】

【図3】

